致倦库蚊对登革Ⅱ型病毒的中肠感染屏障作用

谢　超，赵彤言*，董言德，陆宝麟
（军事医学科学院微生物流行病研究所，北京　100071）

摘要：为探讨致倦库蚊对登革Ⅱ型病毒的中肠感染屏障作用，通过病毒分离、逆转录聚合酶链反应、透射电镜等技术进行了相关研究。结果表明：吸食感染性血液后，登革Ⅱ型病毒能侵染白纹伊蚊中肠上皮细胞并大量复制，但不能侵染致倦库蚊中肠上皮细胞。以上研究证明致倦库蚊对登革Ⅱ型病毒存在中肠感染屏障。

关键词：致倦库蚊；白纹伊蚊；登革Ⅱ型病毒；中肠感染屏障
中图分类号：Q965.8　**文献标识码：**A　**文章编号：**0454-6296（2002）02-0160-05

Mesenteronal infection barrier to dengue 2 virus in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

XIE Chao，ZHAO Tong-Yan*，DONG Yan-De，LU Bao-Lin (Institute of Microbiology and Epidemiology，Academy of Military Medical Sciences，Beijing　100071，China)

Abstract: The mesenteronal infection barrier to dengue 2 virus was examined in *Culex pipiens quinquefasciatus*. Following large dose oral infection，the viral replication was monitored with electron microscopy，and the viral nucleic acid was detected through RT-PCR at intervals in *Cx. pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus*. The results showed that the virus was replicated rapidly in *Ae. albopictus* after infecting mesenteronal epithelial cells. However，dengue 2 virus could not be detected in the same cells and other tissues of *Cx. pipiens quinquefasciatus*，which indicated that the virus was unable to infect and reproduce in it and suggested that the mesenteronal barrier to dengue 2 virus infection exist in this species of mosquito.

Key words: *Culex pipiens quinquefasciatus*；*Aedes albopictus*；dengue 2 virus；mesenteronal infection barrier

关于致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 能否传播登革Ⅱ型病毒（dengue 2 virus，DEN-2），国内外存在的不同认识，已有专文讨论（杨佩英和秦鄂德，1999）。值得注意的是，唐士元等（1987）据经口感染和胸腔接种登革病毒分离分别为阴性和阳性的不同结果，推论致倦库蚊不能成为有效媒介的原因是由于存在中肠屏障。由于致倦库蚊广布于我国南方及全球热带和亚热带地区，进一步研究确定致倦库蚊对 DEN-2 中肠屏障的作用具有十分重要的意义。为此，作者以有效媒介白纹伊蚊为阳性对照，在大剂量病毒感染的基础上，通过病毒分离、RT-PCR 检测以及透射电镜等方法，探讨 DEN-2 侵染这两种蚊虫中肠的规律和致倦库蚊对 DEN-2 的中肠屏障作用。

1　材料与方法

1.1　材料

白纹伊蚊和致倦库蚊：为本实验室养殖的广州株，3～6 日龄成蚊。在 25±1℃、相对湿度（80±5）%、光照 14 h/天的养蚊室饲养。病毒：DEN-2，新几内亚 B 株，鼠脑传代。

1.2　方法

1.2.1　人工感染蚊虫试验：取 3～6 日龄白纹伊蚊和致倦库蚊，饥饿 18～24 h 后，吸取人工感染鼠脑病毒悬液，病毒滴度 $TCID_{50}$ 为 $10^{9.07}$～$10^{10.30}$。吸血 1 h，置 4℃冷冻 5 min 后立即挑饱血蚊，饲喂糖水，29±1℃饲喂 21 天。同时设置吸食正常鼠脑悬液的蚊虫为阴性对照，饲喂方法同感染蚊。

基金项目：总后"九五"医学杰出中青年基金课题
第一作者简介：谢超，女，1970 年 11 月生，汉族，山东人，博士，助研，现从事干细胞研究，E-mail：yuner5426@sina.com
* 通讯作者 Author for correspondence
收稿日期 Received：2000-07-20；接受日期 Accepted：2001-06-10

1.2.2　人工感染蚊虫体内及中肠组织内 DEN-2 的分离与滴度测定：蚊虫吸食感染性血液后，分别于 1 h 和 1、3、5、7、14、21 天收集标本，50 只/组，液氮冻存备用，分别用于整个蚊体内（10 只/组）及蚊中肠组织内（40 只/组）病毒的分离。解剖蚊中肠后，以磷酸盐缓冲液（pH 8.0）洗 3 次。以 1 mL 无血清 DMEM 培养液分别研磨整个蚊虫和解剖的中肠组织并过滤除菌，按常规方法将病毒作 10 倍梯度稀释（$10^{-1}\sim10^{-12}$），接种 C6/36 白纹伊蚊细胞系做微量分离培养并测定病毒滴度 $TCID_{50}$ 值，以吸血 1 h 病毒 $TCID_{50}$ 值为零点作图分析。

1.2.3　RT-PCR 反应检测感染蚊虫体内 DEN-2：

1）标本收集：分别于吸食感染性血液后 1、3、5、7、14、21 天收集白纹伊蚊标本，并于 1 h 和 1、3、5、7、14、21 天收集致倦库蚊标本。20 只/组，液氮冻存备用，另收集正常白纹伊蚊和致倦库蚊各 10 只冻存备用，作为阴性对照。

2）特异性引物设计与合成：P1（上游引物）：CTGATTTCCAT（A/C/G/T）CC（A/G）TG；P2（下游引物）：AAGCTTGAGATGGACTTT。

3）人工感染蚊体内病毒 RNA 的提取：采用 Gibco 公司 TRIzol Reagent 总 RNA 提取试剂，按说明略加改进提取总 RNA。每组取 10 只感染蚊虫，加入 1 mL TRIzol 试剂，迅速研磨，而后室温静止 5 min；加 0.2 mL 氯仿剧烈振荡 15 s，12 000 × g 离心 15 min；小心吸取上层水相，用异丙醇沉淀，70% 乙醇洗 1 次。提取的 RNA 溶解于适量 DEPC 处理的无菌水中，测定 OD_{260} 与 OD_{280} 值，判断 RNA 的质量和纯度，于 −70℃储存备用。

4）病毒 cDNA 第一链合成及 PCR 扩增：利用 TaKaRa 公司 RNA PCR 试剂盒反转录合成 cDNA 第一链。反应体系 20 μL，按以下条件进行反转录反应：42℃，60 min；99℃，5 min；5℃，5 min。反转录合成 cDNA 第一链后，利用 TaKaRa 公司 RNA PCR 试剂盒进行 PCR 扩增，PCR 反应条件如下：94℃预变性 5 min；94℃ 1 min；55℃ 1 min；72℃ 1 min，30 个循环，72℃延伸 8 min。PCR 反应结束后，1.2% 琼脂糖电泳鉴定结果。

1.2.4　透射电镜观察人工感染蚊虫中肠上皮细胞内 DEN-2 感染：吸食感染性血液后，分别于0.5、2、4、8、12、18、24、48 h 和 14 天，每组取 5 只活蚊 4℃冰冻 5 min，解剖拉取中肠，2.5% 戊二醛室温固定 2 h。磷酸缓冲液 4℃过夜，2% 锇酸固定液 4℃重固定 2h。磷酸缓冲液彻底漂洗。乙醇脱水、Epson 包埋后观察切片。

2　结果

2.1　经口感染 DEN-2 后致倦库蚊和白纹伊蚊体内及中肠组织内病毒的分离与测定

2.1.1　人工感染蚊虫体内 DEN-2 的分离与滴度测定（图 1）：吸血后 1 h 直到 21 天，均从人工感染病毒的白纹伊蚊体内分离到了 DEN-2。吸血后 1 h，白纹伊蚊体内病毒滴度 $TCID_{50}$ 为 $10^{9.07}$，感染 1 天后病毒 $TCID_{50}$ 值降至 $10^{4.69}$。而 5 天后白纹伊蚊体内的病毒滴度 $TCID_{50}$ 达到峰值为 $10^{8.30}$，表明此时病毒在其体内已大量复制。至吸血后 21 天，仍在白纹伊蚊体内检测到病毒，并维持在一定的水平（$TCID_{50}$ 为 $10^{5.42}$）。吸血后 1 h 至 1 天，从致倦库蚊体内亦分离到了病毒，病毒滴度 $TCID_{50}$ 分别为 $10^{9.44}$ 和 $10^{3.24}$；但吸血后 2 天直至第 21 天，从致倦库蚊体内一直未检测到病毒。说明 DEN-2 能感染并在白纹伊蚊体内复制，却不能感染致倦库蚊。

2.1.2　人工感染蚊虫中肠组织内 DEN-2 的分离与滴度测定（图 2）：自吸血后 1 天直到 21 天，均从吸食病毒的白纹伊蚊中肠内分离到 DEN-2。吸血后 1 天，白纹伊蚊中肠内病毒滴度 $TCID_{50}$ 为 $10^{5.69}$；3 天后中肠内病毒滴度达峰值，$TCID_{50}$ 值为 $10^{7.87}$，表明此时病毒在其中肠上皮细胞内已大量复制。之后病毒滴度开始降低，第 5 天和第 7 天的病毒滴度维持在较高的水平，$TCID_{50}$ 值分别为 $10^{7.15}$ 和 $10^{7.07}$。至吸血后 21 天，仍在白纹伊蚊中肠内检测到病毒，并维持在一定的水平（$10^{5.21}$）。而吸食感染性血液后 1 天，从致倦库蚊体内亦分离到了病毒，病毒滴度为 $10^{4.15}$，但吸血后 2 天直至第 21 天，从致倦库蚊中肠内一直未检测到病毒。说明 DEN-2 能感染白纹伊蚊中肠上皮细胞并进行大量复制，但不能感染致倦库蚊中肠组织。

2.1.3　RT-PCR 检测人工感染蚊体内 DEN-2 的核酸：吸血后 1、3、5、7、14、21 天均从白纹伊蚊研磨液中扩增出约 500 bp 的特异病毒核酸片段（图 3：A）；在吸血 1 h 和 1 天后的致倦库蚊研磨液内亦扩增出 500 bp 左右的特异条带（图 3：B），但吸血后 3 天至 21 天，均未扩增出特异条带。这一结果与病毒分离结果一致，提示吸血 3 天后，致倦库蚊体内没有病毒存活、复制，因此检测不到病毒核酸。

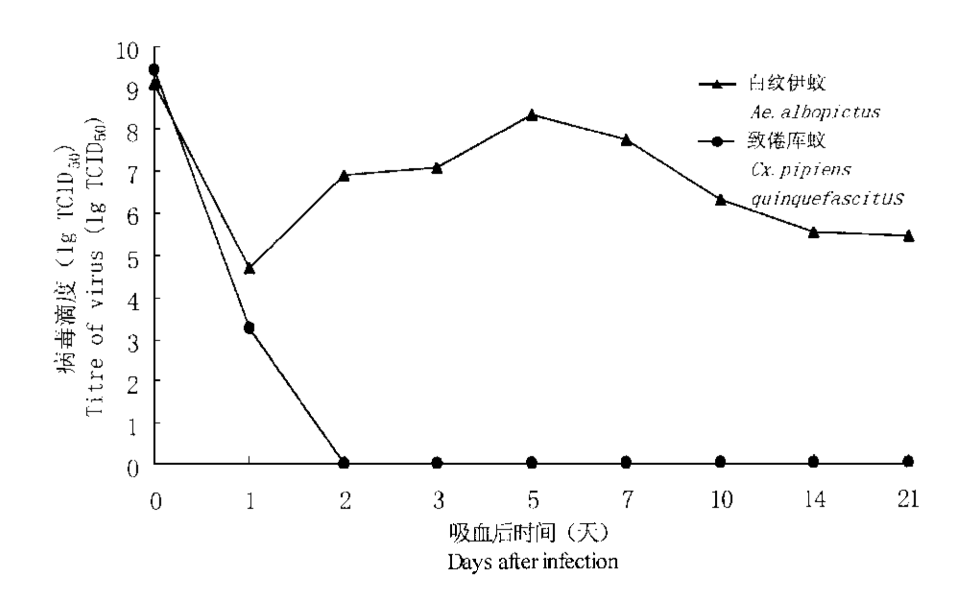


图 1　经口感染后不同时间致倦库蚊和白纹伊蚊蚊体内 DEN-2 生长曲线

Fig. 1　Growth curves of DEN-2 in *Ae. albopictus* and *Cx. pipiens quinquefasciatus* after oral infection

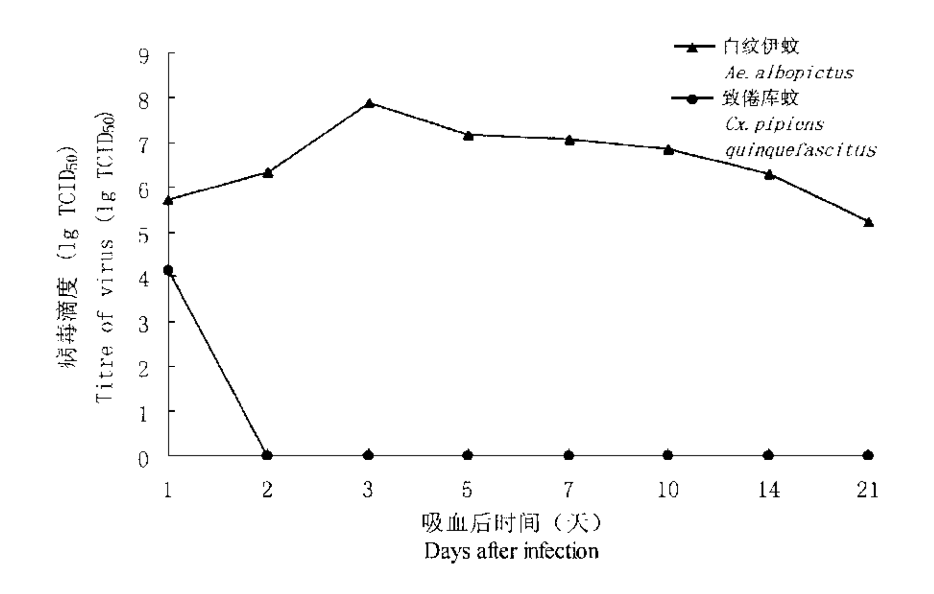
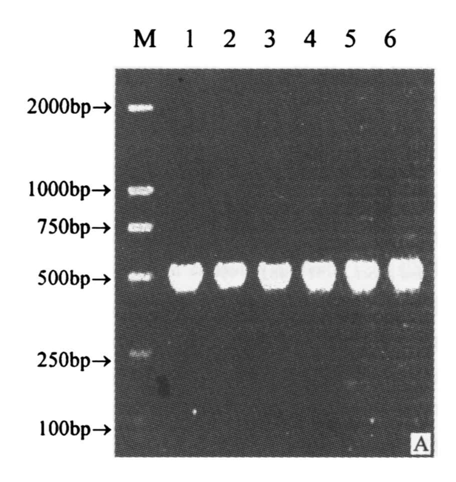


图 2　经口感染后不同时间致倦库蚊和白纹伊蚊中肠组织内 DEN-2 生长曲线

Fig. 2　Growth curves of DEN-2 in mesenteron of *Ae. albopictus* and *Cx. pipiens quinquefasciatus* after oral infection

2.1.4　经口感染 DEN-2 后蚊虫中肠上皮细胞内 DEN-2 感染的透射电镜观察：白纹伊蚊吸食感染性血液后 2 h，在靠近上皮细胞膜内、外侧部位，均观察到裸露的病毒粒子，有些空泡内也有病毒粒子（图 4：A）。12～18 h，细胞核内出现与病毒复制有关的核内带状丝，细胞内亦出现大量空泡，这与病毒蛋白合成及复制有关，此时病毒已在中肠上皮细胞内大量复制。有些空泡内有散在分布的病毒粒子，细胞质内则有由病毒核衣壳构成的晶状体结构，有的晶状体结构由多达上千个病毒核衣壳均匀排列构成（图 4：B），一个细胞内可观察到很多这样的晶状体结构。感染后 48 h 以及经过一定的潜伏期（14 天）后，在白纹伊蚊上皮细胞内，仍观察到晶状体结构的病毒以及散在的病毒颗粒（图 4：C），提示病毒在该蚊上皮细胞内可持续存活并复制。而致倦库蚊吸食感染性血液以后，整个观察期间（即使经过一定的外潜伏期），均未在其上皮细胞内以及围食膜内发现 DEN-2，说明 DEN-2 无法

侵入并感染致倦库蚊中肠上皮细胞。



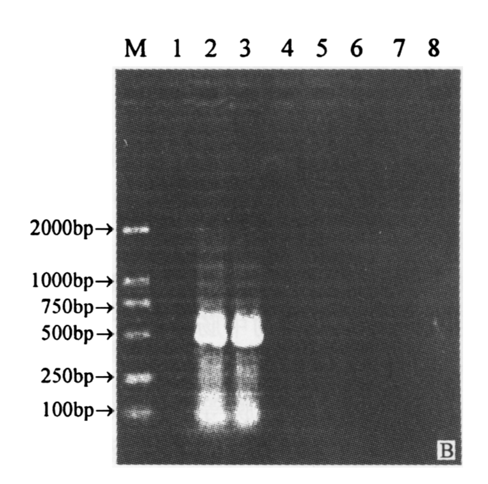


图 3 白纹伊蚊（A）和致倦库蚊（B）体内 DEN-2 的 RT-PCR 检测

Fig. 3 RT-PCR detection of DEN-2 in *Ae. albopictus*（A）and *Cx. pipiens quinquefasciatus*（B）at different times after oral infection

A. M：TaKaRa DL2000 PCR 标准（TaKaRa DL2000 Marker）；1～6：分别为感染 1、3、5、7、14、21 天的白纹伊蚊（in 1, 3, 5, 7, 14, and 21 day(s) after infection with DEN-2, respectively）；B. M：TaKaRa DL2000 PCR 标准（TaKaRa DL2000 Marker）；1：阴性对照（control）；2～8：分别为感染 1 h 和 1、3、5、7、14、21 天的致倦库蚊（in 1 h, and 1, 3, 5, 7, 10, 14, and 21 day(s) after infection with DEN-2, respectively）

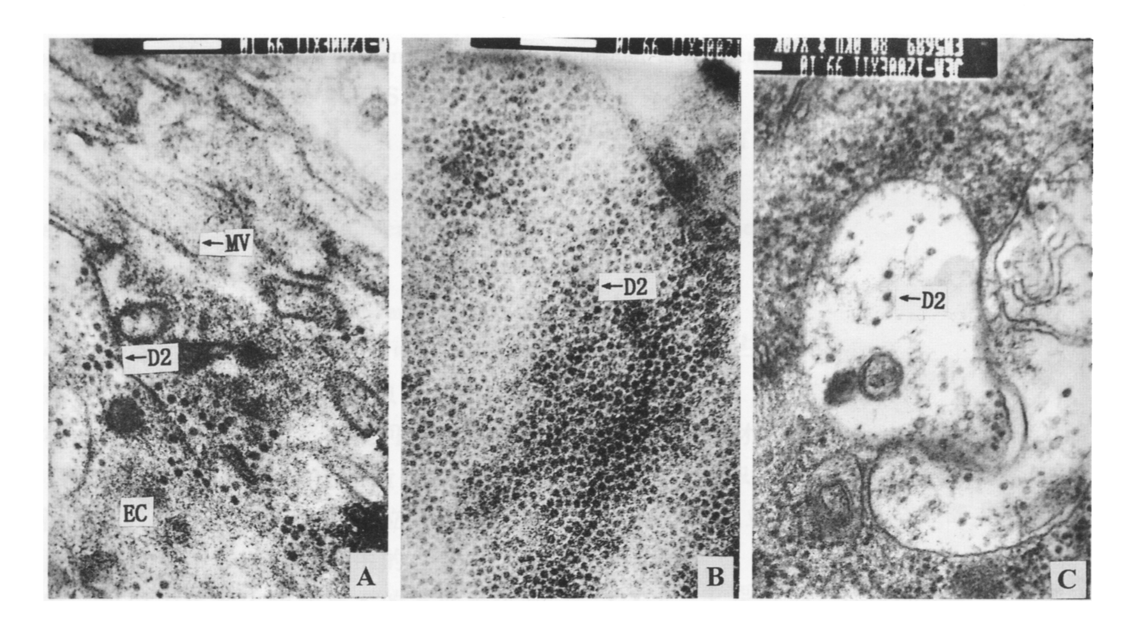


图 4 白纹伊蚊中肠上皮细胞内 DEN-2 透射电镜观察

Fig. 4 Electron-microscopic observation on distribution of DEN-2 in mesenteronal epithelial cells of *Ae. albopictus*

A. 吸血后 2 h（2 h after oral infection）；B. 吸血后 18 h（18 h after oral infection）；C. 吸血后 48 h（48 h after oral infection）

D2：Dengue 2 virus；EC：上皮细胞 epithelial cell；MV：微绒毛 microvillar

3 讨论

在自然界中，因蚊虫对虫媒病毒（如 DEN 病毒）存在一系列的屏障作用，而完全不受病毒感染，其中“中肠感染屏障”是限制许多虫媒病毒感染蚊虫媒介的主要因素之一（Leake, 1992; Mclean, 1955）。本研究中通过病毒分离、滴度测定、RT-PCR 检测等方法，从多方面证实在相同感染条件下，DEN-2 能迅速侵染白纹伊蚊中肠等组织

并大量复制，却不能侵染致倦库蚊中肠组织。整个试验期间（即使经过一定的外潜伏期），均未在致倦库蚊蚊体及中肠组织内分离到病毒，也未检测到病毒核酸。本试验是在大剂量病毒（$10^{8.9}$ ~ $10^{10.5}$ $TCID_{50}$）感染的基础上进行的，病毒滴度远高于常见的脊椎动物病毒血症。致倦库蚊中肠组织不能感染病毒并非因病毒感染剂量低所致。由此可见，致倦库蚊对 DEN-2 病毒确实存在中肠感染屏障。

蚊虫在病毒感染中的中肠屏障，包括中肠胰蛋白酶、围食膜和（或）上皮细胞受体以及病毒从上皮细胞逸出及通过基底膜等因素（Hardy *et al*.，1983）。从本研究结果来看，由于致倦库蚊感染 DEN-2 病毒后，病毒未能进入中肠细胞。因此，在中肠屏障中起作用的因素应该是胰蛋白酶、围食膜或（和）中肠细胞受体。这三者中何者起主导作用有待于进一步研究。

参 考 文 献 （References）

Hardy J L，Houk E J，Kramer L D，1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Ann. Rev. Entomol.*，28：229 – 262.

Leake C J，1992. Arbovirus-mosquito interactions and vector specificity. *Parasitol. Today*，8（4）：123 – 128.

Mclean D M，1955. Multiplication of viruses in mosquitoes. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*，31：481 – 490.

Tang S Y，Zhang Q E，Li P *et al*.，1987. The study on the vector competency to dengue virus of several mosquitoes in China. *Bull. Acta Mili. Med Sci.*，11（6）：458 – 462.［唐士元，张启恩，李平等，1987. 我国几种蚊虫对登革病毒媒介效能的实验研究. 军事医学科学院院刊，11（6）：458 – 462］

Yang P Y，Qin E D，1999. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Beijing：People's Military Medical Sciences Press. 98-200.［杨佩英，秦鄂德，1999. 登革热和登革出血热. 北京：人民军医出版社. 98 – 200］